

诱导型一氧化氮合酶在喉癌中的表达及其临床意义

蒋成义¹, 周 蕾², 詹晓东¹, 舒继红¹

[摘要]目的:观察诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthases, iNOS)在喉癌组织中的表达,探讨iNOS在喉癌侵袭转移中的作用。方法:应用免疫组织化学S-P法检测66例喉癌组织及其癌旁正常组织中iNOS的表达情况,并分析其表达与喉癌患者临床分期、病理分级、淋巴结转移等方面的关系。结果:iNOS在喉癌组织中表达率为81.82%,高于癌旁正常组织的6.06% ($P < 0.05$)。不同临床分期、临床分型喉癌患者的iNOS表达率差异有统计学意义($P < 0.05$),而在年龄、病理分级以及淋巴结转移方面差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:iNOS可能是喉癌侵袭转移机制中的重要肿瘤标志物,在喉癌的淋巴结转移中具有一定作用,对于喉癌淋巴结转移的判断具有重要意义。

[关键词] 喉肿瘤; 一氧化氮合酶; 免疫组织化学; 病理学; 临床

[中国图书资料分类号] R 739.65 [文献标识码] A

Expression and clinical significance of inducible nitric oxide synthases in laryngeal carcinoma

JIANG Cheng-yi¹, ZHOU Lei², ZHAN Xiao-dong¹, SHU Ji-hong

(1. Department of Otorhinolaryngology Head and Neck Surgery, 2. Department of Pathology,

The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of inducible nitric oxide synthases(iNOS) in laryngocarcinoma tissues and its role in the invasion and metastasis of laryngeal carcinoma. **Methods:** The expression of iNOS in 66 cases of laryngeal carcinoma tissues and the normal mucous membrane were detected by immunohistochemistry S-P method. The correlation between the expression of iNOS and the clinical stage, clinical classification, pathological grade and lymph node metastasis of laryngeal carcinoma was analyzed. **Results:** The positive rate of iNOS in laryngeal carcinoma tissues and the normal mucous membrane was 81.82% and 6.06%, respectively ($P < 0.05$); the expression of iNOS was significantly correlated with the clinical stage and classification of patients with laryngeal carcinoma ($P < 0.05$), but had no relation with the patients' age, pathological grade or lymph node metastasis ($P > 0.05$). **Conclusions:** iNOS may act as an important tumor marker in lymph node metastasis of laryngeal carcinoma. It plays an important role in the invasion, metastasis and prognosis of laryngeal carcinoma.

[Key words] laryngeal neoplasms; nitric oxide synthases; immunohistochemistry; pathology; clinical

喉癌是耳鼻咽喉科常见的恶性肿瘤,在头颈部上皮来源的原发恶性肿瘤中排第二位。肿瘤细胞的侵袭和转移过程是一个多步骤、多因素、多功能相互作用的连续或断续的复杂过程。一般认为,肿瘤细胞脱落、基膜的降解以及肿瘤血管的生成构成了恶性肿瘤侵袭和转移的三步学说^[1]。在这一机制中,有许多重要肿瘤标志物参与其中,起到至关重要的作用。大量的研究^[2]表明,由一氧化氮合酶(NOS)催化L-精氨酸生成的NO在机体内参与了众多的病理、生理过程,与肿瘤的侵袭和转移行为关系密切。本研究采用免疫组织化学法检测诱导型一氧化氮合

酶(inducible nitric oxide synthases, iNOS)在喉癌中的表达,旨在探讨iNOS在喉癌侵袭转移中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料 66例标本选自我科2005年5月至2006年12月的喉鳞状细胞癌手术后标本。均经病理证实为鳞状细胞癌,取距癌旁>1cm正常黏膜作为对照。所选病例在本院病理科均有含完整临床资料的存档蜡块。66例喉鳞状细胞癌患者中,男62例,女4例;年龄39~79岁;均行手术治疗,术前未经放疗及化疗。按照UICC 1992年标准进行TNM分期,其中I期10例,II期22例,III期21例,IV期13例。66例喉鳞状细胞癌中声门型39例,声门上型27例;无淋巴结转移42例,有淋巴结转移24例,淋巴结转移者(PN+)术后均经病理证实;病理分级:I级18例,II级36例,III级12例。

[收稿日期] 2011-07-11

[基金项目] 安徽省高校优秀青年人才基金资助项目(2010SQRL127)

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 1.耳鼻咽喉-头颈外科 2.病理科,安徽蚌埠 233004

[作者简介] 蒋成义(1975-),男,硕士,讲师,副主任医师。

1.2 免疫组织化学检测 iNOS 的表达 采用免疫组织化学 S-P 法检测 iNOS 表达。兔抗人 iNOS 多克隆抗体、S-P 免疫组织化学试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。PBS 缓冲液为本院配制。取玻片 200 张,置清洁液中浸泡 14 h。取出玻片用自来水冲洗后,置 60 °C 烤箱中烘干备用。所挑标本均经术后 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋。每例蜡块连续切片 4 张,切片厚度 4 ~ 5 μm,二甲苯脱蜡,无水乙醇脱水,放入 60 °C 烤箱中至少 2 h 以上。3 张作苏木精-伊红染色,其余 3 张备染。石蜡切片经水化后,用 PBS(pH 7.4) 冲洗 3 次,每次 3 min。每张切片加一滴过氧化物酶抑制剂,以阻断内源性过氧化物酶的活性,室温下孵育 20 min。将标本放置在修复液(枸橼酸盐缓冲溶液 pH 6.0,95 °C) 中 10 min,用微波炉高火加热 10 min,室温下自来水冷却 10 min。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。去除 PBS 液,每张切片加 1 滴非免疫性动物血清,室温下孵育 20 min,减少非特异性背景,不必冲洗,吸去多余血清。每张切片加 1 滴一抗,4 °C 冰箱中过夜。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。去除 PBS 液,每张切片加 1 滴生物素标记的二抗,室温下孵育 20 min。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。每张切片加 1 滴链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶溶液。室温下孵育 20 min。PBS 冲洗 3 次,每次 3 min。去除 PBS 液,每张切片加 2 滴新鲜配置的 DAB 溶液,显微镜下观察 3 ~ 10 min。显色完成后,自来水冲洗,苏木精复染,乙醇脱水干燥,二甲苯透明,中性树脂胶封固。实验步骤严格按照产品说明书进行,北京中杉金桥生物技术开发有限公司提供阳性对照片,阴性对照片除用 PBS 代替一抗外,其余步骤相同。

1.3 结果判断 iNOS 以细胞质中见棕色颗粒为阳性信号。每张切片观测 10 个视野,根据 iNOS 阳性细胞染色范围分为阴性、阳性,无明显阳性细胞或阳性细胞 < 25% 者为阴性,阳性细胞 ≥ 25% 为阳性。

1.4 统计学方法 采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 iNOS 在喉癌及其癌旁正常组织中的表达

iNOS 在 66 例喉癌组织中有 54 例(81.82%) 阳性表达,在其癌旁正常黏膜组织中有 4 例(6.06%) 阳性表达,差异有统计学意义($\chi^2 = 76.89, P < 0.05$) (见图 1、2)。

2.2 iNOS 与喉癌各临床病理参数的关系 iNOS 阳性率在喉癌临床分期、临床分型差异有统计学意义

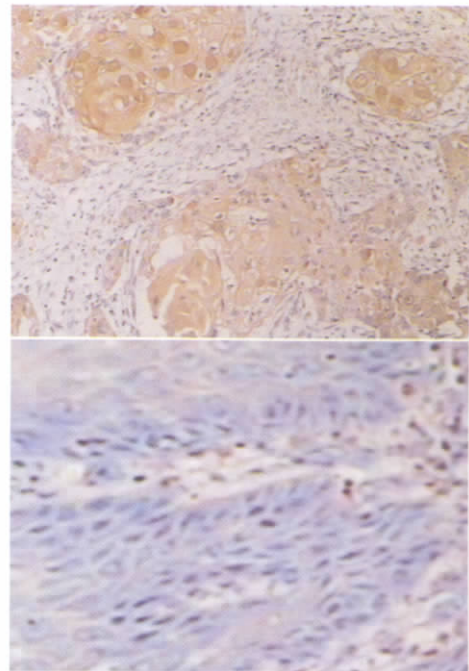


图1 iNOS在喉癌细胞质、细胞核均表达 图2 iNOS在癌旁正常组织中未表达(均为免疫组织化学S-P法)

义($P < 0.05$),而在年龄、病理分级以及淋巴结是否转移差异无统计学意义($P > 0.05$) (见表 1)。

表 1 iNOS 的表达与喉癌各临床病理参数的关系(n)

临床病理参数	n	iNOS		阳性率 (%)	χ^2	P
		+	-			
年龄						
≤60 岁	16	12	4	75.00	0.19	>0.05
>60 岁	50	42	8	84.00		
病理分级						
I	18	14	4	77.78	1.55 [△]	>0.05
II	36	30	6	85.71		
III	12	8	4	66.67		
临床分期						
I+II	32	21	11	65.63	10.95	<0.01
III+IV	34	33	1	97.06		
临床分型						
声门型	39	28	11	71.79	4.90	<0.05
声门上型	27	26	1	96.30		
淋巴结转移★						
PN-	42	33	9	78.57	0.33	>0.05
PN+	24	21	3	87.50		

注:★淋巴结转移情况选取的是术后有明确病理报告证实的病例进行统计,共 24 例;△示 H_c 值

3 讨论

近年来,虽然在喉癌的诊断和治疗方面取得了很大进展,但中、晚期喉癌的生存率仍未见提高,而

且晚期的手术治疗往往有一定致残率,降低了患者的生存质量和存活率。声门上型喉癌 I、II、III、IV 期的 5 年生存率分别是 100%、87%、72%、42%,声门型喉癌 T1、T2 和 T3 的 5 年生存率分别是 100%、91%、79%^[3]。根据肿瘤侵袭、转移机制三步学说,喉癌肿瘤细胞在黏附因子减少的情况下易于脱离原发灶形成游离的细胞,在基质金属蛋白酶等作用下溶解破坏基质,使间质天然屏障得到破坏,游离的肿瘤细胞突破基膜,同时在促进血管形成及提高血管通透性等因子的帮助下,使游离的肿瘤细胞易于穿透毛细血管进入循环系统形成转移灶,实现淋巴结转移。iNOS 作为肿瘤侵袭转移的三步机制中的相关肿瘤标志物,可能在肿瘤侵袭转移中发挥重要作用。

NOS 是以 L-精氨酸为底物合成 NO 的酶,在人体内分为 2 种,固有型 NOS(eNOS) 和 iNOS。固有型是细胞本身固有的,在正常生理性刺激下即可引起血管内皮、神经细胞合成少量 NO,协助调节血压和传递神经信息,但其活性须钙或钙调素存在。iNOS 在正常情况下不表达活性,巨噬细胞、中性粒细胞、免疫细胞和肿瘤细胞被激活而表达 iNOS mRNA 再翻译成 iNOS,催化产生 NO。而大量的研究^[4]表明,由 NOS 催化 L-精氨酸生成的 NO 在机体内参与了众多的病理生理过程,与肿瘤的侵袭和转移行为关系密切。在一些人类肿瘤中也有 iNOS 表达,不同肿瘤细胞中 NOS 表达与否及表达程度不同,了解不同瘤组织中 NOS 的表达规律,有利于了解 NO 与肿瘤发生、发展的关系。关于 NO 与肿瘤生长、侵袭及转移的作用关系,有研究^[5]表明,NO 作为重要的血管扩张剂,可刺激肿瘤细胞血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 产生,参与 VEGF 促血管生成过程中的每一步。而肿瘤细胞生成的 VEGF 可增加内皮细胞生成 NO,可增加内皮细胞 NOS 的活性^[6]。VEGF 与内皮细胞表面的受体结合后,激活 C-src 酪氨酸激酶,通过细胞内钙调蛋白及磷酸肌醇激酶途径增强 NOS 的表达,刺激产生 NO。同时,NO 通过增强 VEGF 基因启动子的活性来增加 VEGF 表达,增加 VEGF 的合成^[7]。另有报道^[8]认为,NO 在 VEGF 促血管内皮细胞增殖和迁移中起重要作用,而且 NO 还参加 VEGF 的促血管通透性的作用^[9]。

Fukumura 等^[10]的研究表明,喉鳞状细胞癌组织中癌组织和血管内皮细胞产生 NO 有促进血管生成的作用,而且 eNOS 的催化作用在促血管生成过

程中占优势。Franchi 等^[11]认为, iNOS 的活性与喉肿瘤血管生成有关。Cavilanes 等^[12]认为,在咽喉部鳞状细胞癌的不同发展阶段,各型 NOS 的优势不同,原位癌早期 iNOS 占优势,中晚期咽喉癌 cNOS 占优势。目前的研究表明, NOS 的异常表达对喉癌的发生、发展有一定的影响,并且与其恶性程度有关,可通过 NO 促进喉癌微血管的形成,并通过参与 VEGF 的生血管机制来实现对肿瘤血管的调节。最近的研究^[13]证实, VEGF-C 和 VEGF-D 通过其受体血管内皮因子受体-3 信号转导途径可诱导肿瘤淋巴管生成,促进肿瘤淋巴结转移。而由于 NO 在体内存留时间短,目前尚无较好的直接检测方法,多数通过检测 NOS 来间接反映。本研究显示喉癌组织中 iNOS 的表达率达 81.82%,明显高于正常黏膜组织中 iNOS 表达率,我们推测 iNOS 对喉癌的生长产生的 NO 可以促进肿瘤细胞的增殖。同时本研究结果亦表明,临床 III ~ IV 期、声门上型喉癌患者的 iNOS 表达率高于临床 I ~ II 期、声门型($P < 0.05$)。符合临床上声门上型喉癌较声门型喉癌易于淋巴结转移这一特点。说明随着喉癌恶性程度的加深, iNOS 的表达也增强,因此我们认为 iNOS 有促进喉癌生长的作用,对喉癌的侵袭和转移及预后有一定临床价值,可作为检测喉癌恶性程度的指标。

[参 考 文 献]

- [1] Meyer T, Hart IR. Mechanisms of tumour metastasis [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(2): 214-221.
- [2] Bremnes RM, Veve R, Gabrielson E, et al. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biology and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol* 2002, 20(10): 2417-2428.
- [3] 屠规益. 现代头颈肿瘤外科学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 36-42.
- [4] Vakkala M, Kahlos K, Lakari E, et al. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in in situ and invasive breast carcinomas [J]. *Clin cancer Res*, 2000, 6(6): 2408-2416.
- [5] Reynolds LP, Grazul-Bilska AT, Redmer DA. Angiogenesis in the corpus luteum [J]. *Endocrin* 2000, 12(1): 1-9.
- [6] Jozkowicz A, Pankiewicz J, Dulak J, et al. Nitric oxide mediates the mitogenic effects of insulin and vascular endothelial growth factor but not of leptin in endothelial cells [J]. *Acta Biochim Pol*, 1999, 46(3): 703-715.
- [7] Tsuji T, Sasaki Y, Tanaka M, et al. Microvessel morphology and vascular endothelial growth factor expression in human colonic carcinoma with or without metastasis [J]. *Lab Invest*, 2002, 82(5): 555-562.

表 3 2 组患者术前及术后肝功能变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	丙氨酸氨基 转移酶(U/L)	白蛋白 (g/L)	总胆红素 ($\mu\text{mol/L}$)	凝血酶原 时间(s)
术前($\bar{x} \pm s$)					
无痛组	25	49.12 ± 28.65	33.26 ± 4.57	45.12 ± 23.86	14.95 ± 2.19
普通组	10	49.79 ± 27.31	33.14 ± 4.63	44.73 ± 25.41	15.04 ± 2.14
t	—	0.06	0.07	0.04	0.11
P	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
术后 7 d($\bar{d} \pm s_d$)					
无痛组	25	-0.30 ± 0.67**	-0.21 ± 0.96	-0.26 ± 0.82	-0.57 ± 0.77**
普通组	10	-0.68 ± 0.56**	0.56 ± 0.73	0.29 ± 0.59	-0.16 ± 0.84
t	—	1.58	1.04	0.10	1.39
P	—	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

配对 t 检验: 同组与术前比较 **P < 0.01

静脉曲张的肝硬化患者每年有 8% 发展为静脉曲张, 轻度静脉曲张患者每年有 8% 发展为重度静脉曲张^[2]。静脉曲张出血的发病率每年为 5% ~ 15%, 首次出血的病死率为 40% ~ 70%, 近期再出血病死率高达 20%^[3]。因此, 防治食管静脉曲张出血是降低肝硬化患者病死率最为重要的措施。内镜下食管静脉曲张套扎术是治疗和预防肝硬化并发食管静脉曲张破裂出血的有效方法, 成功率高达 98.9%^[4]。不仅急诊止血成功率高, 多次治疗可使曲张静脉很快消失。

传统方法的胃镜检查, 患者由于紧张、恐惧, 以及镜身对咽喉部黏膜的刺激, 往往导致恶心、呕吐、憋闷、分泌物多, 影响胃镜插入和观察。胃镜下食管静脉曲张套扎术比普通胃镜检查时间长, 要求视野清晰、定位准确。套扎时, 若恶心、呕吐频繁, 食管蠕动过快, 给治疗定位造成困难, 镜端难以密切接触曲张静脉, 造成吸引不良而破裂出血或皮圈滑脱。而用无痛胃镜, 患者则处于完全松弛的状态, 不会产生恶心、呕吐, 分泌物也少, 视野清晰, 更有利于准确进

行静脉套扎治疗。用于无痛胃镜的静脉麻醉药丙泊酚是一种新型快速短效的全麻药, 其临床特点是起效快、持续时间短、苏醒迅速而平稳, 不良反应少。近年来, 该药物已广泛用于临床各科麻醉及重症患者镇静。该药具有高亲脂性, 具有从血液到中枢神经系统和周围组织快速分布的特点^[5]。

本研究中无痛组的 25 例次患者均治疗成功, 未发生严重不良反应及并发症, 咳嗽、恶心、呕吐、躁动等反应明显低于普通组, 术后遗忘度达 100%。相反, 普通组进镜时则因剧烈呕吐而造成食管静脉曲张破裂出血 1 例, 拒绝进一步治疗 1 例。本组 25 例次均于术前及术后 7 d 检查肝功能, 因丙泊酚起效快, 作用时间短, 半衰期仅为 2 ~ 4 min, 患者用药前后肝功能并无显著变化。因此, 肝硬化食管静脉曲张在无痛胃镜下套扎治疗术是切实可行和安全有效的, 不失为一种较好的方法, 值得推广。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会消化内镜学分会食管胃静脉曲张组. 消化道静脉曲张及出血的内镜诊断和治疗规范试行方案(2009 年) [J]. 中华消化内镜杂志, 2010, 27(1): 1-4.
- [2] 中华医学会消化病学分会. 肝硬化门静脉高压食管胃静脉曲张出血的防治共识(2008, 杭州) [J]. 中华消化杂志, 2008, 28(8): 551-558.
- [3] Garcia-Tsao G, Sanyal AJ, Grace ND, et al. Prevention and management of gastroesophageal variceal hemorrhage in cirrhosis [J]. Am J Gastroenterol, 2007, 102(9): 2086-2102.
- [4] 刘玉杰, 张志坚, 黄友明, 等. 肝硬化食管静脉曲张出血的急诊内镜下套扎治疗 [J]. 中华消化内镜杂志, 2004, 21(3): 163-165.
- [5] 郑国启, 张秀刚, 于永礼, 等. 食管曲张静脉套扎术肝硬化分级与异丙酚用量的相关性 [J]. 实用医药杂志, 2007, 24(6): 641-645.

(本文编辑 章新生)

(上接第 1308 页)

- [8] Robinson ES, Khankin EV, Choueiri TK, et al. Suppression of the nitric oxide pathway in metastatic renal cell carcinoma patients receiving vascular endothelial growth factor-signaling inhibitors [J]. Hypertension, 2010, 56(6): 1131-1136.
- [9] Ergenekon E, Bozkaya D, Goktas T, et al. Are serum nitric oxide and vascular endothelial growth factor levels affected by packed red blood cell transfusions? [J]. Hematology, 2010, 15(3): 170-173.
- [10] Fukumura D, Gohongi T, Kadambi A, et al. Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(5): 2604-2609.

- [11] Franchi A, Gallo O, Paglierani M, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in laryngeal neoplasia: correlation with angiogenesis [J]. Head Neck, 2002, 24(1): 16-23.
- [12] Cavilanes J, Moro MA, Lizasoain I, et al. Nitric oxide synthase activity in human squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. Laryngoscope, 1999, 109(1): 148-152.
- [13] He Y, Rajantie I, Ilmonen M, et al. Preexisting lymphatic endothelium but not endothelial progenitor cell are essential for tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis [J]. Cancer Res, 2004, 64(11): 3737-3740.

(本文编辑 章新生)